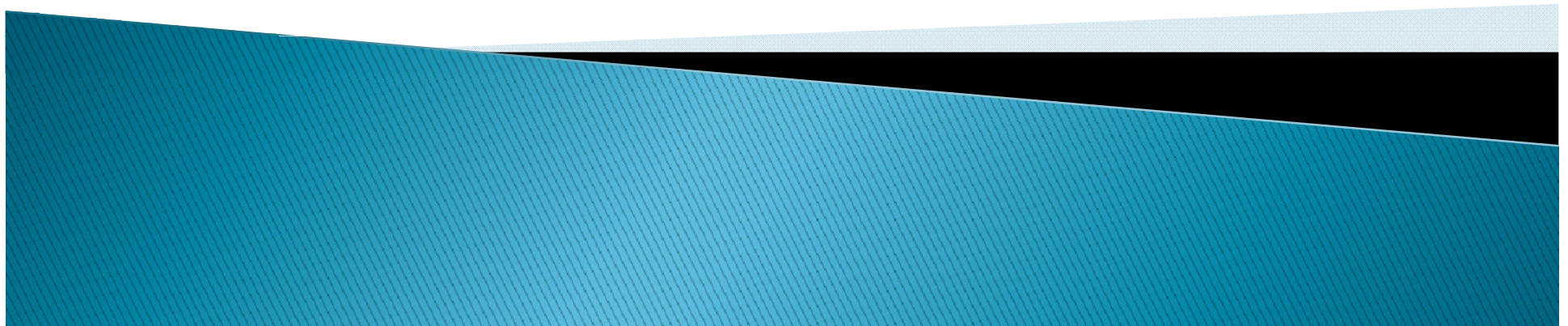


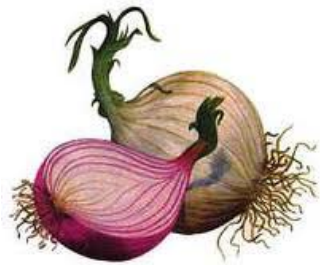
# Prácticas Obligatorias Propuestas en el Programa de Contenidos (PAU)

## Materia Biología

**Dra. Ana María Ortuño Tomás**

Dpto. Biología Vegetal (Fisiología Vegetal)  
Facultad de Biología  
Universidad de Murcia





# Práctica 1: Observación de los fenómenos osmóticos en epidermis de cebolla.



# Práctica 1: Observación de los fenómenos osmóticos en epidermis de cebolla.

**Objetivo:** Visualizar los fenómenos osmóticos de turgencia y plasmolisis celular.

## Introducción:

La célula vegetal adulta encierra una voluminosa vacuola separada del medio que la rodea por una membrana llamada tonoplasto. Esta se comporta en primera aproximación como membrana semipermeable con respecto a numerosas sustancias disueltas, como por ejemplo el cloruro sódico o la sacarosa.

La pared celular rígida, limita la posibilidad de dilatación de la célula y en consecuencia la absorción de agua. Ello constituye por otra parte, un marco gracias al cual, los cambios de agua son perceptibles directamente.

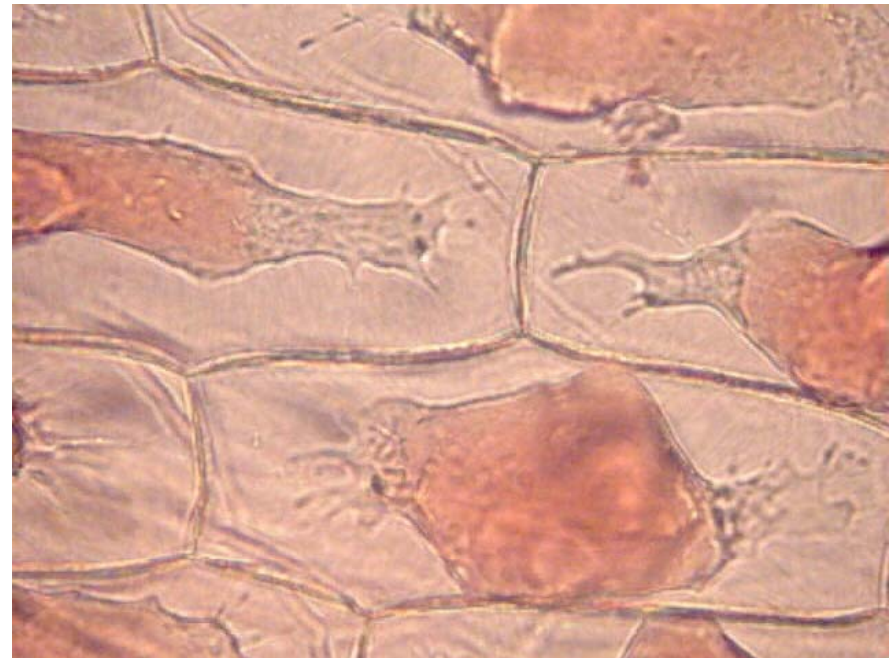




# Práctica 1: Observación de los fenómenos osmóticos en epidermis de cebolla.

## Material:

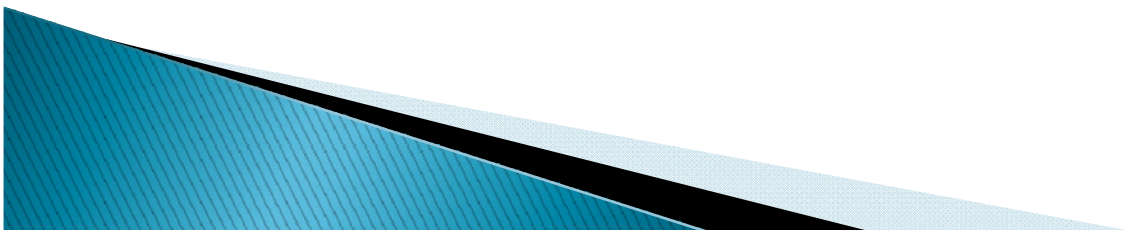
- ▶ Hojas de cebolla.
- ▶ Colorante rojo neutro al 1 % en tampón fosfato 0,1 M pH=7,4.
- ▶ Disolución de NaCl al 6 %.
- ▶ Microscopio óptico.



# Práctica 1: Observación de los fenómenos osmóticos en epidermis de cebolla.

## Manipulación:

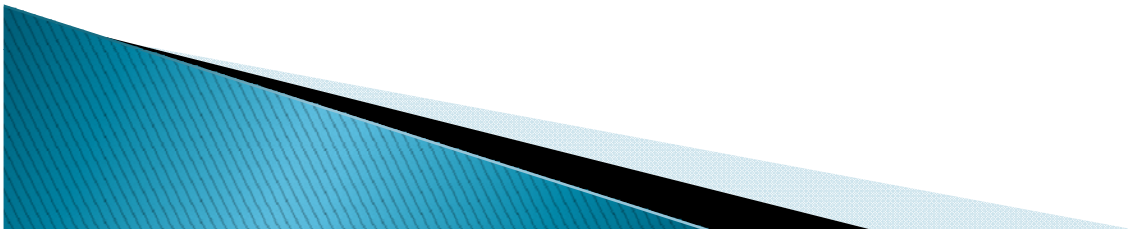
- ▶ Sirviéndose de pinzas y bisturí, tomar un fragmento de epidermis, de la parte interna del casco de cebolla, de aproximadamente 0,5 cm de lado.
- ▶ Sumergirlo durante un minuto en la disolución de rojo neutro al 1 % solubilizado en tampón fosfato 0,1 M pH=7,4.
- ▶ Montar el fragmento de epidermis en el porta, tapándolo a continuación con el cubre, eliminando el exceso de líquido succionando con papel de filtro y observar al microscopio.



# Práctica 1: Observación de los fenómenos osmóticos en epidermis de cebolla.

## Manipulación:

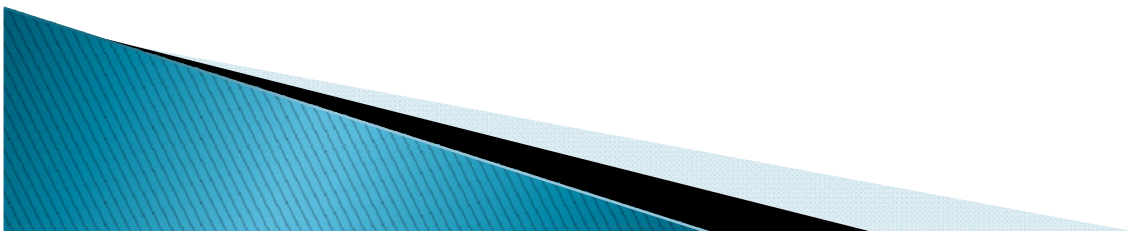
- ▶ Reemplazar el colorante, en la preparación, con disolución de NaCl al 6%, colocando unas gotas de esta disolución en el porta-objetos, junto a un borde del cubre, pero sin mancharlo y colocando un fragmento de papel de filtro en el lado opuesto, para aspirar por capilaridad el colorante.
- ▶ La disolución de cloruro sódico ocupará el lugar de aquel, lo que se reconoce porque el líquido de la preparación se aclara. Repetir los lavados cuatro o cinco veces y observar inmediatamente la preparación al microscopio.



# Práctica 1: Observación de los fenómenos osmóticos en epidermis de cebolla.

Información que debe adquirir o cuestiones que debe resolver el alumno con el desarrollo de la práctica:

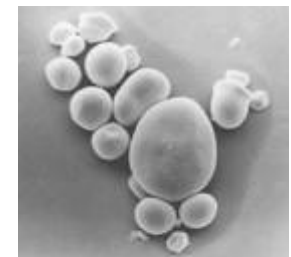
- ▶ ¿A qué se debe la gran extensión de la coloración de la célula tras la tinción con rojo neutro?
- ▶ ¿Qué papel desempeñan las diferentes concentraciones de las disoluciones de tampón fosfato y de cloruro sódico sobre la del jugo vacuolar?
- ▶ ¿A qué atribuye los cambios que se observa en la vacuola en cada caso?







## Práctica 2: Observación y/o tinción de los granos de almidón de la patata con Lugol.





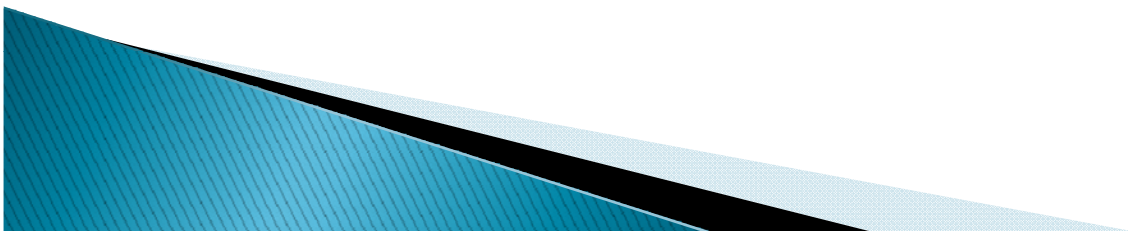
## Práctica 2: Observación y/o tinción de los granos de almidón de la patata con Lugol.

**Objetivo:** Observar granos de almidón de la patata y conocer la técnica de tinción con Lugol para el reconocimiento de la presencia de dicho polisacárido.

### Introducción:

El Lugol es una disolución acuosa de yodo y yoduro potásico que sirve para averiguar si, en una disolución de azúcares no reductores (reacción de Fehling negativa), existe el polisacárido almidón (prueba de lugol positiva).

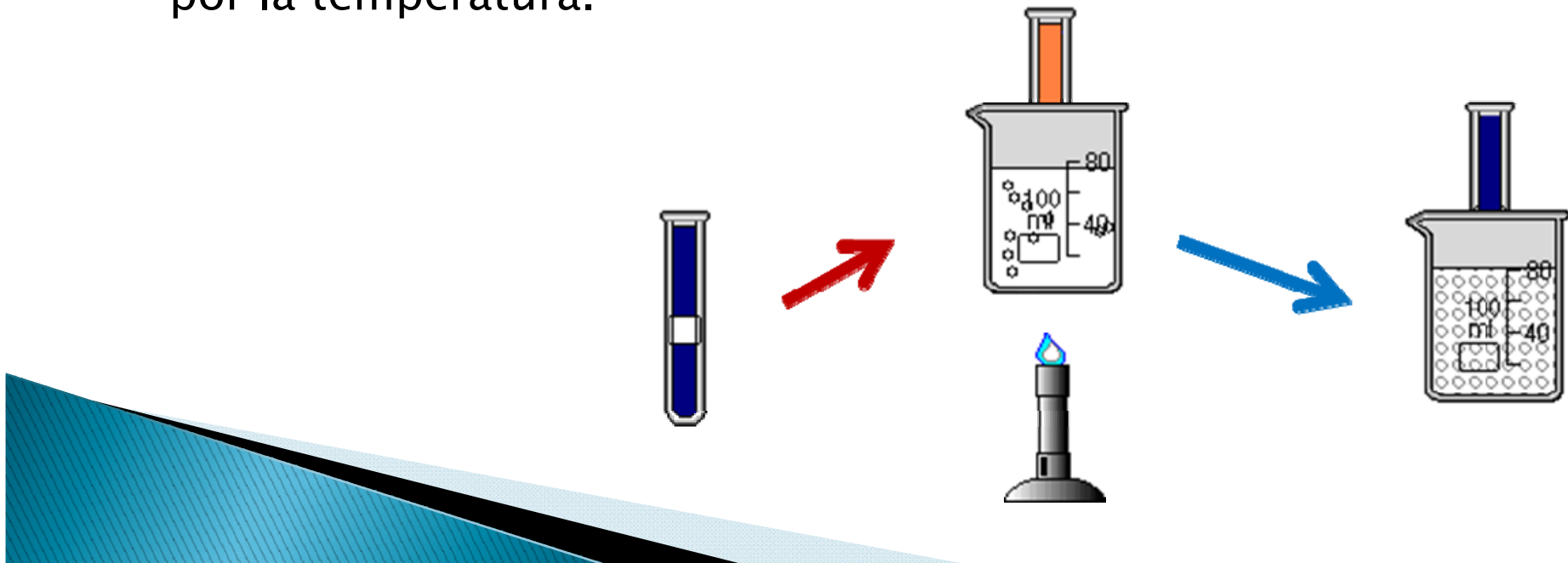
El almidón es un polisacárido mezcla de amilosa y amilopectina.



## Práctica 2: Observación y/o tinción de los granos de almidón de la patata con Lugol.

Cuando el almidón se pone en contacto con unas gotas de Lugol toma un color azul-violeta característico (la amilosa se colorea de azul oscuro a negro y la amilopectina se colorea entre naranja y amarillo).

Se trata de una reacción no química, en la que se forma un compuesto de inclusión del yodo en el interior de las hélices de la amilosa. Esta inclusión es reversible y está condicionada por la temperatura.



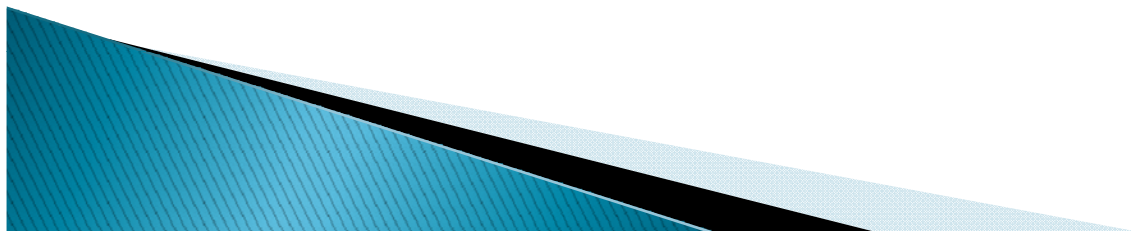
# Práctica 2: Observación y/o tinción de los granos de almidón de la patata con Lugol.

## Material:

- ▶ Patata
- ▶ Microscopio óptico
- ▶ Reactivo Lugol (yodo-yoduro potásico 1%)
- ▶ Suspensión acuosa de almidón

## Manipulación:

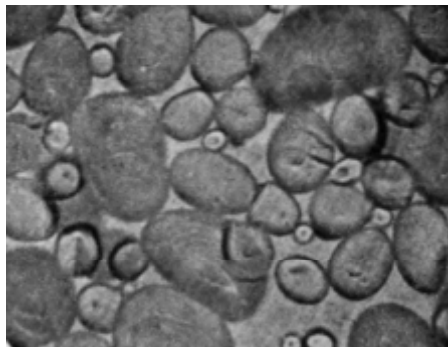
- ▶ Coger un trozo de patata, añadirle una gota de agua en la superficie y hacer un raspado de tejido.
- ▶ Se obtiene una suspensión de granos de almidón que enturbia la gota de agua, dándole color blanquecino.
- ▶ Poner una gota de esta suspensión sobre el porta, colocar el cubre y observar al microscopio.



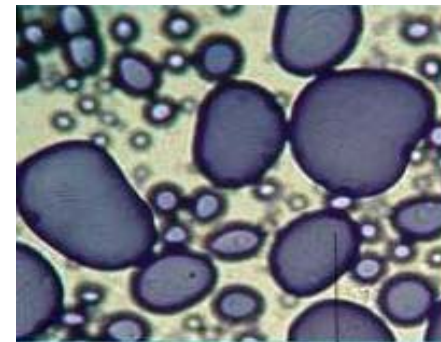
## Práctica 2: Observación y/o tinción de los granos de almidón de la patata con Lugol.

### Manipulación:

- ▶ Poner ahora una gota de reactivo yodo-yoduro potásico (1%) sobre el porta, en contacto con el borde del cubre, y con un papel de filtro en el borde opuesto, hacer que penetre en la preparación.
- ▶ Observar de nuevo en el microscopio.



+ Lugol  
→



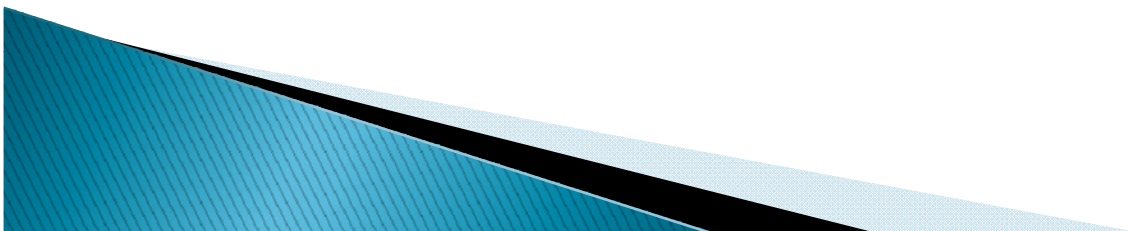


## Práctica 2: Observación y/o tinción de los granos de almidón de la patata con Lugol.

### Manipulación:

En caso de que no se disponga de microscopio:

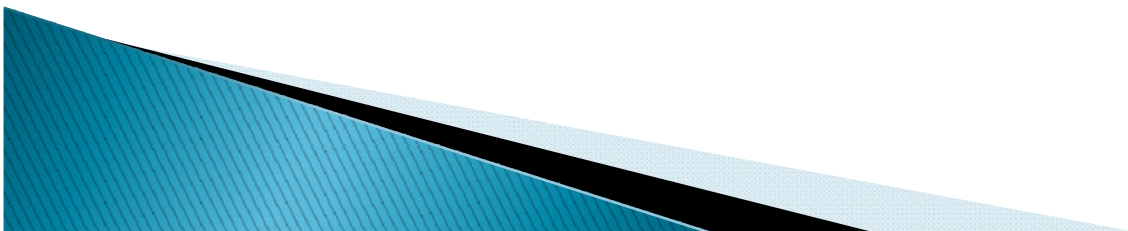
- ▶ Se puede hacer reaccionar la suspensión obtenida tras el raspado de la patata con una gota de reactivo yodo-yoduro potásico (1%), para observar el cambio de coloración.
- ▶ Se coloca en un tubo de ensayo 3 ml de una suspensión acuosa de almidón, se le añaden 3 gotas de la solución de Lugol, se observará la aparición del color azul-violeta característico.
- ▶ A continuación se calienta suavemente, sin que llegue a hervir, se observará que pierde el color, posteriormente se enfría el tubo de ensayo con agua del grifo y después de unos 2-3 min reaparecerá el color azul.



## Práctica 2: Observación y/o tinción de los granos de almidón de la patata con Lugol.

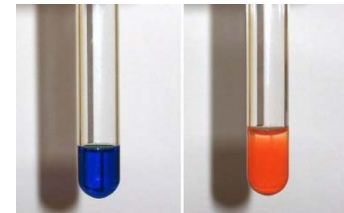
Información que debe adquirir o cuestiones que debe resolver el alumno con el desarrollo de la práctica:

- ▶ Conocer la forma de los granos de almidón obtenidos a partir de este material vegetal.
- ▶ Relacionar el tamaño de los granos y el número de capas que se observan en ellos.
- ▶ Conocer la posibilidad de utilizar el reactivo yodo-yoduro potásico (1%) para detectar la presencia de almidón en un medio.
- ▶ Fundamento de la reacción de color y de los cambios con la temperatura.





## Práctica 3: Determinación del poder reductor de azúcares.



# Práctica 3: Determinación del poder reductor de azúcares.

**Objetivo:** Poner de manifiesto la presencia de azúcares reductores en un medio, mediante una reacción de color de tipo redox.

## **Introducción:**

Los monosacáridos y la mayoría de los disacáridos poseen poder reductor, que deben al grupo carbonilo que tienen en su molécula.

El reactivo de Fehling es utilizado con el fin de poner de manifiesto la capacidad reductora de un azúcar. Consiste en una mezcla de dos reactivos: el Fehling A (sulfato cúprico), de color azul, y el Fehling B (tartrato sódico-potásico), incoloro.

Tras la reacción con el glúcido reductor, se forma óxido de Cobre (I), que tras ser calentado da un precipitado de color rojo. De este modo, el cambio de color indica que se ha producido una reacción de tipo redox y que por tanto, el glúcido presente es reductor.



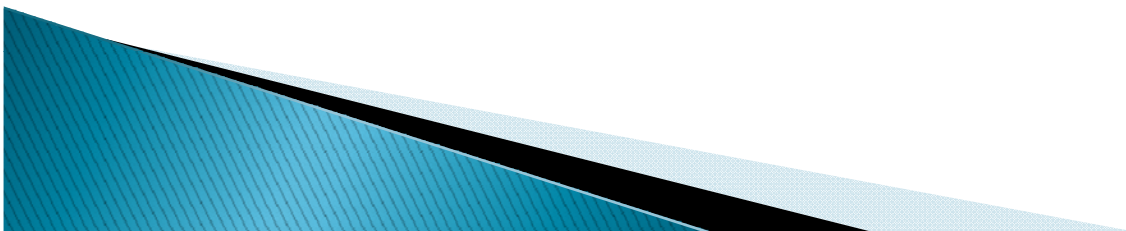


# Práctica 3: Determinación del poder reductor de azúcares.

## Material y Manipulación:

### 1ª parte

- ▶ Poner en tubos de ensayo 3 ml de solución acuosa de glucosa, fructosa, sacarosa y almidón.
- ▶ Añadir en cada tubo 1 ml de solución de Fehling A (contiene  $\text{CuSO}_4$ ) y 1 ml de Fehling B (tartrato sódico-potásico, para alcalinizar el medio y permitir la reacción).
- ▶ Calentar los tubos en un baño maría hasta que hiervan durante 10 minutos.
- ▶ La reacción será positiva si la muestra se vuelve de color rojo y será negativa si queda azul o cambia a un tono azul-verdoso.



# Práctica 3: Determinación del poder reductor de azúcares.

## Material y Manipulación:

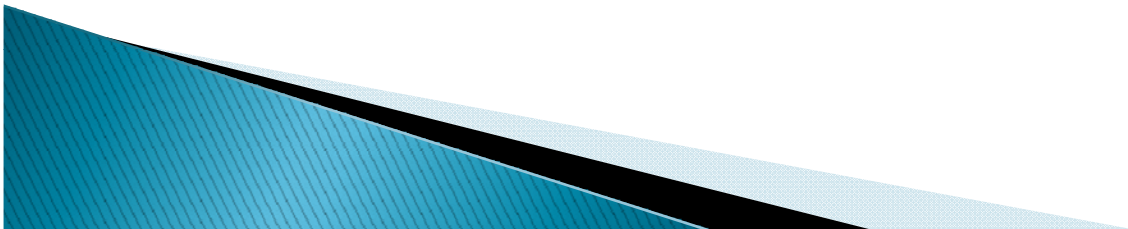
### 2ª parte

La sacarosa es un disacárido que carece de poder reductor (porque en el enlace de los monosacáridos que forman parte de su molécula participan los carbonos anoméricos), por lo que la reacción con el reactivo de Fehling es negativa, tal y como ha quedado demostrado en la 1ª parte.

Sin embargo, en presencia de HCl y en caliente, la sacarosa se hidroliza y se descompone en los monosacáridos que la forman, glucosa y fructosa, que sí son reductores.

La prueba de que se ha verificado la hidrólisis se realiza con el reactivo de Fehling y, si el resultado es positivo, aparecerá un precipitado rojo (tras el calentamiento en baño maría a ebullición durante 10 min).

Si el resultado es negativo, la hidrólisis no se habrá realizado correctamente, y si en el resultado final aparece una coloración verde en el tubo de ensayo se debe a una hidrólisis parcial de la sacarosa.

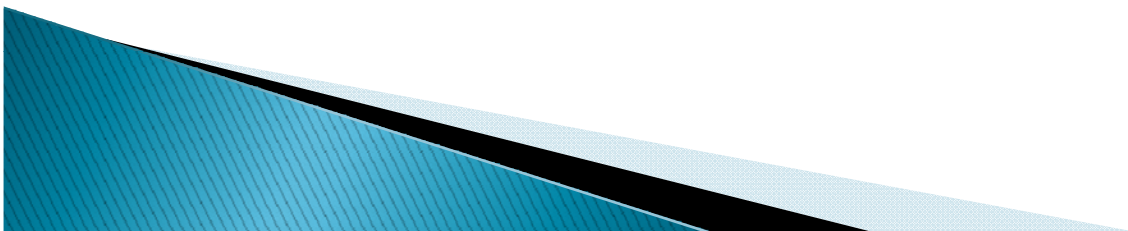


# Práctica 3: Determinación del poder reductor de azúcares.

## Material y Manipulación: 2ª parte

Para llevar a cabo esta parte de la práctica:

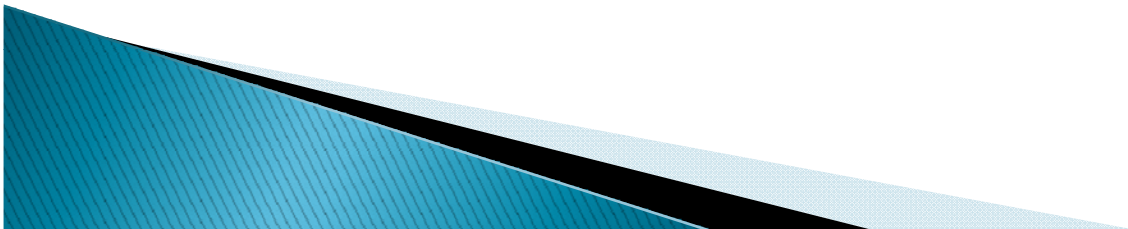
- ▶ Tomar 3 ml de solución de sacarosa y añadir 10 gotas de HCl diluido.
- ▶ Calentar a la llama del mechero durante unos 5 minutos.
- ▶ Dejar enfriar.
- ▶ Neutralizar añadiendo 3 ml de solución alcalina.
- ▶ Realizar la prueba de Fehling como se indica en la 1ª parte.



# Práctica 3: Determinación del poder reductor de azúcares.

Información que debe adquirir o cuestiones que debe resolver el alumno con el desarrollo de la práctica:

- ▶ Establecer a qué se deben las diferencias observadas entre los cuatro carbohidratos analizados (glucosa y fructosa dan positiva la reacción de Fehling, mientras que sacarosa y almidón no dan positiva la reacción).
- ▶ Analizar e interpretar los resultados obtenidos tras la hidrólisis de la sacarosa.





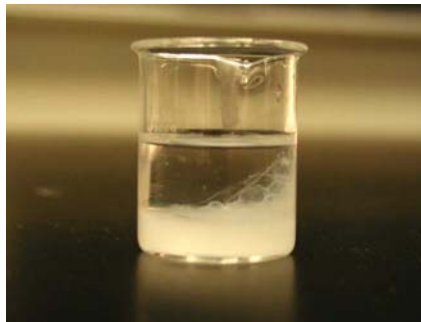


## Práctica 4: Extracción y aislamiento de ADN.



# Práctica 4: Extracción y aislamiento de ADN

**Objetivos:** Romper o lisar con detergentes la pared celular, la membrana plasmática y la membrana nuclear para dejar libre el ADN y hacer que precipite en alcohol, para poder visualizar las fibras del ADN.



# Práctica 4: Extracción y aislamiento de ADN

## ¿QUÉ ES EL ADN?



ADN es la abreviatura del **Acido Desoxirribonucleico**. Es la molécula de la vida pues constituye el material genético de todos los organismos vivos y se encuentra en el interior del núcleo de las células. El ADN es el componente químico primario de los cromosomas y el material que constituye los genes.

Su **función** esencial es la de conservar la información durante la división celular, transmitirla de generación en generación y hacer efectiva la información genética que contiene.



Cedido amablemente  
por la Dra. Leonor Ruiz



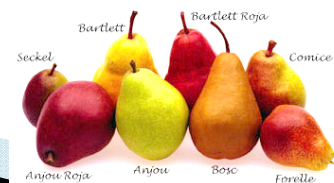
## ETAPAS Y FUNDAMENTO DE LA EXTRACCIÓN DE ADN DE PLANTAS

TAPAS	¿QUÉ HACEMOS?	¿POR QUÉ LO HACEMOS?	¿CÓMO LO HACEMOS?
1ª Etapa	Rompemos la pared celular y las membranas plasmática y nuclear	Para liberar el contenido celular y nuclear, en el que se encuentra el ADN	Mezclando el material vegetal con una solución de extracción y trituramos
2ª Etapa	Separamos el ADN de proteínas y restos celulares	Las proteínas y restos celulares interfieren en la extracción de ADN	Añadiendo al tampón de extracción zumo de piña o de papaya que contienen un enzima, la papaína, que elimina las proteínas
3ª Etapa	Precipitamos el ADN	La molécula de ADN es soluble en agua pero no en alcohol, por lo que precipitará en la interfase entre ambos	Añadimos alcohol sobre la fase acuosa que contiene el ADN disuelto

## APLICACIONES

### Agricultura y ganadería:

Nos ayuda a conocer el genoma de los seres vivos para saber más de ellos. Gracias al estudio del ADN podemos distinguir entre especies y variedades, encontrar características de interés agronómico (producción, sabor, color, resistencias a enfermedades,...). Obtener nuevas variedades mejoradas.



# Protocolo de Extracción de ADN

Equipos	Productos
<ul style="list-style-type: none"><li>• Tubos plástico</li><li>• Vasos de plástico</li><li>• Colador</li><li>• Cucharilla de café</li><li>• Una batidora</li><li>• Hielo</li><li>• Gasa para colar</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>• Guisantes</li><li>• Agua destilada</li><li>• Detergente lavavajillas</li><li>• Sal</li><li>• Zumo de piña o de papaya</li><li>• Alcohol de 96º muy frío</li></ul>



**AHORA VIENE LA PARTE DIVERTIDA:**

Cedido amablemente  
por la Dra. Leonor Ruiz

1 Tu fuente de ADN va a ser 30gr de guisantes



2. **Tampón de extracción:** En un vaso echamos media cucharadita de detergente de lavavajillas, una pizca de sal y media cucharadita de zumo de piña. Añadimos 30 ml de agua destilada.



3.- Mezclamos esta solución con los guisantes



4.- Trituramos la mezcla, con la batidora, segundos

a velocidad máxima durante 30

5.- Filtramos el líquido obtenido con un colador y gasa.

6.- Llenamos la mitad de un tubo con la disolución filtrada.

7.- Añadimos cuidadosamente la misma cantidad de alcohol muy frío, haciéndolo resbalar por las paredes del tubo para que forme una capa sobre el filtrado.

8.- Dejamos reposar durante 2 ó 3 minutos

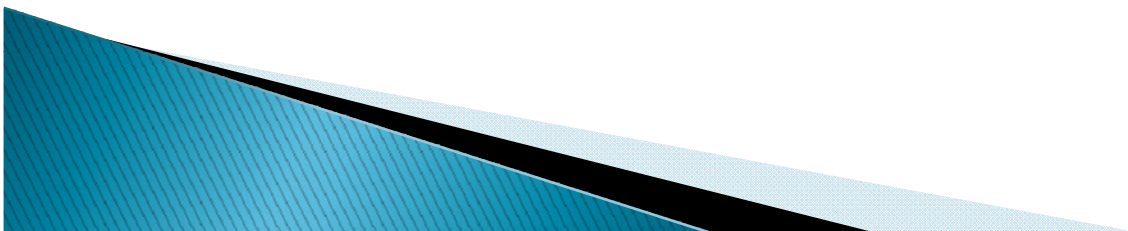
9.- Podemos ver una madeja algodonosa ¡Enhorabuena estáis viendo el ADN!

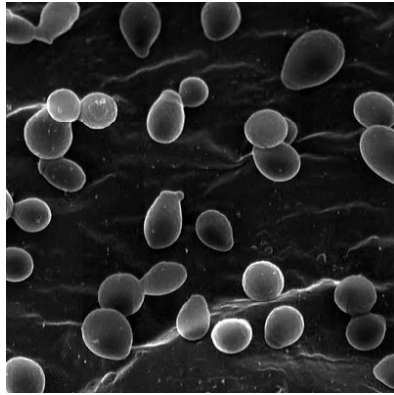


# Práctica 4: Extracción y aislamiento de ADN.

Información que debe adquirir o cuestiones que debe resolver el alumno con el desarrollo de la práctica:

- ▶ ¿Para qué se utiliza el detergente y el NaCl en la extracción?
- ▶ ¿Qué componente aporta el zumo de piña o de papaya y cuál es su utilidad?
- ▶ ¿Por qué se incorpora finalmente el etanol muy frío al medio?





## Práctica 5: Cultivo de levaduras. Estudio de la Respiración.



# Práctica 5: Cultivo de levaduras. Estudio de la Respiración.

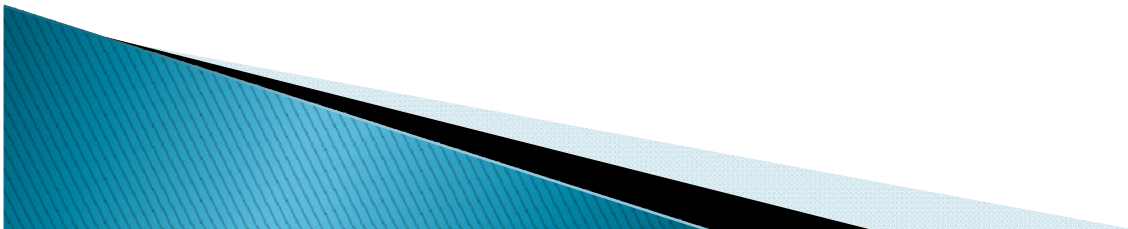
**Objetivo:** Estudiar la producción de  $\text{CO}_2$  durante la respiración e investigar el efecto de un inhibidor de la glicolisis.

## **Introducción:**

La respiración es un proceso por el cual las células obtienen energía, mediante la degradación de compuestos orgánicos tales como los azúcares, de alto contenido energético.

La glicolisis consiste en la conversión de un azúcar sencillo (hexosa) en dos moléculas de piruvato.

Esta ruta prácticamente común a todos los seres vivos, consta de varios pasos catalizados enzimáticamente.



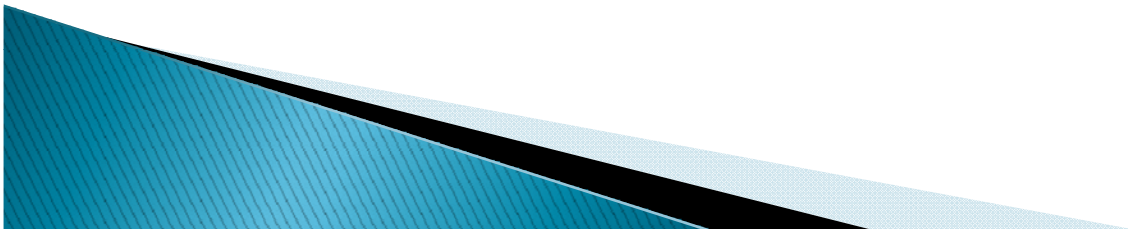
# Práctica 5: Cultivo de levaduras. Estudio de la Respiración.

## Introducción:

Uno de ellos, el paso de 2-Fosfoglicerato a Fosfoenolpiruvato, está catalizado por el enzima Enolasa, que necesita la presencia de iones  $Mg^{2+}$  para poder actuar.

En presencia de iones  $F^{-}$ , el  $Mg^{2+}$  se compleja en forma de  $MgF_2$ , con lo cual se inhibe la glicolisis y no hay respiración.

En el transcurso de la glicolisis se producen, por cada molécula de glucosa, 2 moléculas de ATP, y otras dos de coenzimas reducidos ( $NADH + H^{+}$ ).



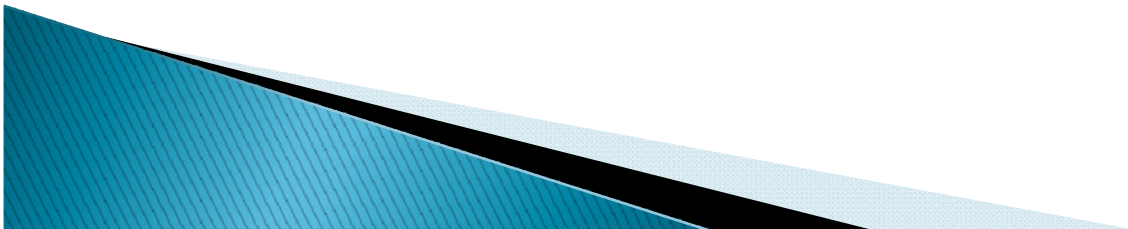
# Práctica 5: Cultivo de levaduras. Estudio de la Respiración.

## Introducción:

El piruvato puede sufrir distintas transformaciones dependiendo del tipo de organismo y de las condiciones en que se encuentre.

En presencia de  $O_2$ , los seres aerobios y facultativos continúan la oxidación del piruvato, a través del ciclo de Krebs y de la cadena de transporte de electrones de las mitocondrias, hasta dar  $CO_2$  y  $H_2O$  como productos finales.

Los organismos anaerobios, y los facultativos en ausencia de  $O_2$ , transforman el piruvato en otros compuestos más reducidos, para regenerar el  $NAD^+$  necesario para continuar la glicólisis, con lo cual la mayor parte de la energía de la glucosa es desaprovechada.





# Práctica 5: Cultivo de levaduras. Estudio de la Respiración.

## Introducción:

Esta vía se conoce con el nombre de fermentación, y dependiendo del producto final se le llama alcohólica, láctica, etc....

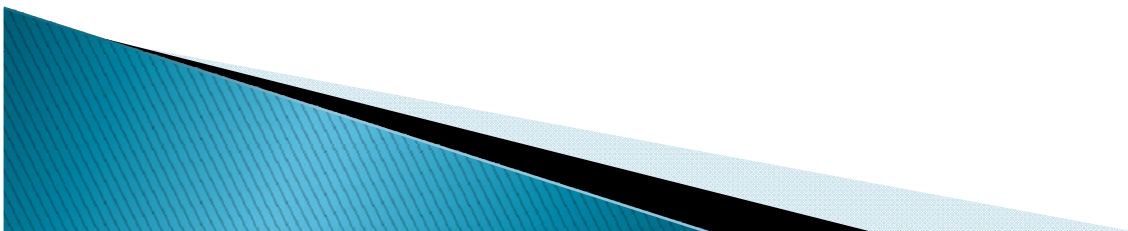
En el caso que vamos a estudiar, las levaduras *Saccharomyces cerevisiae* son organismos facultativos, que en ausencia de  $O_2$  producen  $CO_2$  y etanol a partir del piruvato, por lo cual son muy utilizados industrialmente, por ejemplo en la fabricación de la cerveza.



# Práctica 5: Cultivo de levaduras. Estudio de la Respiración.

## Material:

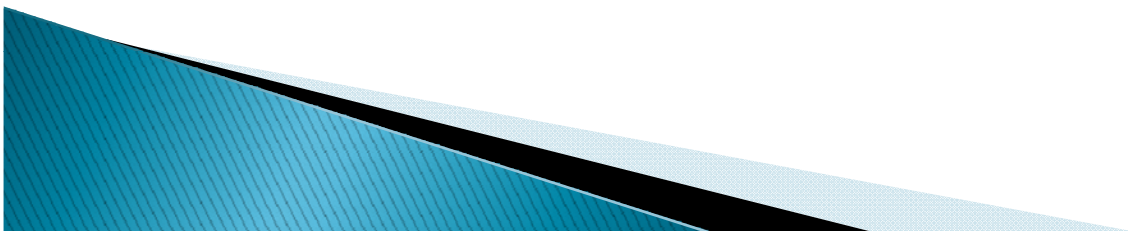
- ▶ Levaduras en suspensión acuosa durante 24 h a 25°C.
- ▶ Disolución de glucosa al 5%.
- ▶ Disolución de NaF 0,01, 0,05 y 0,10 M
- ▶ Tubos de ensayo para respirómetro



# Práctica 5: Cultivo de levaduras. Estudio de la Respiración.

## Manipulación:

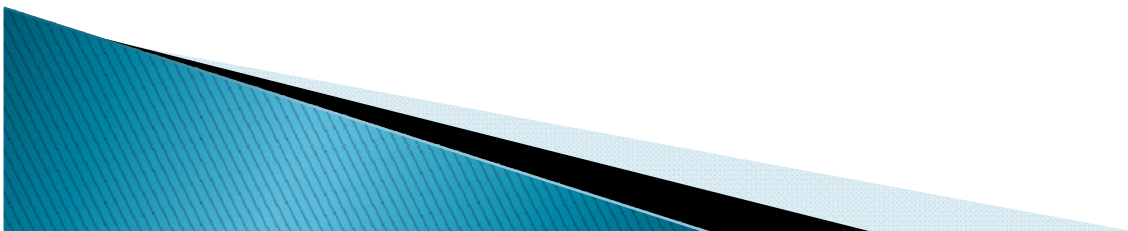
- ▶ Antes de empezar a operar, rotule 5 tubos graduados, numerándolos del 1 al 5 en la parte cerrada del tubo.
- ▶ Para construir el respirómetro simple, llene con suspensión de levaduras, agua, solución de glucosa e inhibidor según se indica a continuación en la Tabla.
- ▶ Coloque un tubo de ensayo grande (de mayor diámetro que el graduado) sobre el graduado introduciéndolo lo más posible, y presionando ambos, invierta el conjunto rápidamente, de manera que derrame la menor cantidad de líquido posible.



# Práctica 5: Cultivo de levaduras. Estudio de la Respiración.

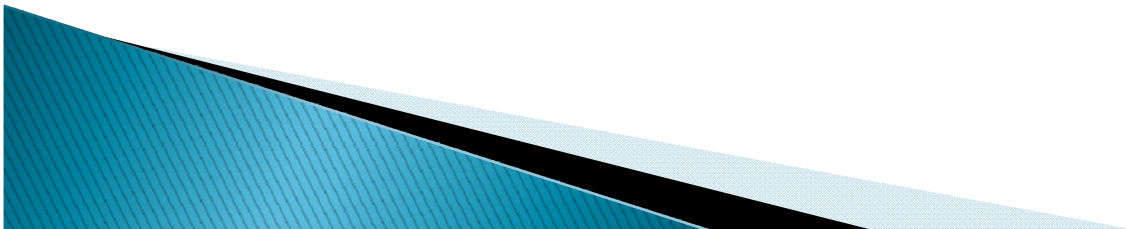
## Manipulación:

- ▶ Se mide el volumen de aire que queda entre el líquido y el fondo del tubo graduado e invertido, y se anota.
- ▶ Si las levaduras respiran, el  $\text{CO}_2$  desprendido se acumulará en la cámara de aire, aumentando la presión sobre el líquido, con lo que éste será desplazado y el volumen gaseoso aumentará.
- ▶ Al cabo de una hora aproximadamente, midiendo el volumen final de la cámara gaseosa y restándolo del inicialmente obtenido, tendremos una medida de la cantidad de respiración que haya tenido lugar.



# Práctica 5: Cultivo de levaduras. Estudio de la Respiración.

Nº Tubo	Suspensión de levadura	Agua destilada	Solución de glucosa 10%	NaF	Volumen inicial cámara gaseosa	Volumen final cámara gaseosa	Diferencia de volúmenes (indicativo del CO <sub>2</sub> desprendido)
1	5 ml	10 ml					
2	5 ml	5 ml	5 ml				
3	5 ml		5 ml	5 ml (0,01M)			
4	5 ml		5 ml	5 ml (0,05M)			
5	5 ml		5 ml	5 ml (0,1M)			





# Práctica 5: Cultivo de levaduras. Estudio de la Respiración.

Información que debe adquirir o cuestiones que debe resolver el alumno con el desarrollo de la práctica:

- ▶ Razonamiento sobre los procesos que están ocurriendo en cada uno de los 5 tubos.
- ▶ ¿Cuál es la función del tubo 1?
- ▶ ¿Por qué se añade glucosa a los tubos 2, 3, 4 y 5?
- ▶ Diferencias observadas en los tubos 3, 4 y 5 (inhibición parcial o total dependiendo de la concentración del inhibidor).

